

PCT/KR 01 / 01295

RO/KR 30. 7. 2001

REC'D 17 AUG 2001
WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 44142 호
Application Number PATENT-2000-0044142

출원년월일 : 2000년 07월 31일
Date of Application JUL 31, 2000

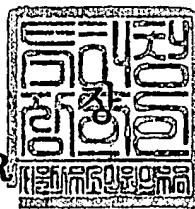
출원인 : 주식회사 삼양제넥스
Applicant(s) SAMYANG GENEX CORPORATION

2001 년 07 월 16 일

특허청
COMMISSIONER

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



020000044142

2001/7/1

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0116
【제출일자】	2000.07.31
【국제특허분류】	C12N 12/00
【발명의 명칭】	피 972 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 피972 유전자를 세포내에서 생산할 수 있는 아데노바이러스
【발명의 영문명칭】	Expression vector for expressing P972 gene for cancer therapy and adenovirus producing the same
【출원인】	
【명칭】	주식회사 삼양제넥스
【출원인코드】	1-1998-002549-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김대건
【성명의 영문표기】	KIM,Daegun
【주민등록번호】	680620-1117810
【우편번호】	305-348
【주소】	대전광역시 유성구 화암동 63-2 삼양제넥스 생명공학연구소
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조원경
【성명의 영문표기】	CHO,Won-Kyung
【주민등록번호】	681027-2709413
【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛 아파트 137-303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정년철
【성명의 영문표기】	JUNG,Neon cheol
【주민등록번호】	701225-1674616
【우편번호】	305-348

020000044142

2001/7/1

【주소】 대전광역시 유성구 화암동 63-2 삼양제넥스 생명공학연구소
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 성영림
【성명의 영문표기】 SEONG, Young Rim
【주민등록번호】 670207-2110317
【우편번호】 305-333
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 114-10
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 임동수
【성명의 영문표기】 IM,Dong-Soo
【주민등록번호】 520103-1025419
【우편번호】 305-345
【주소】 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 107-604
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 배인수
【성명의 영문표기】 BAE, Insoo
【주민등록번호】 620125-1696611
【우편번호】 305-348
【주소】 대전광역시 유성구 화암동 63-2 삼양제넥스 생명공학연구소
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 흥승서
【성명의 영문표기】 HONG, Seung-Suh
【주민등록번호】 570921-1024413
【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 462-2 청구나래아파트 109동
404호
【국적】 KR

020000044142

2001/7/1

【발명자】

【성명의 국문표기】 이현수
【성명의 영문표기】 LEE, Hyun-Soo
【주민등록번호】 420623-1041310
【우편번호】 137-040
【주소】 서울특별시 서초구 반포동 550-18 제우하우스 101호
【국적】 KR

【미생물기탁】

【기탁기관명】 생명공학연구소 부설 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 0806BP
【수탁일자】 2000.06.21
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 출
원인 주식회사 삼양제넥
스 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	0	면	0 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	29,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통		

020000044142

2001/7/1

【요약서】

【요약】

본 발명은 세포성장 억제 단백질로 알려진 P972 (Gadd45 γ , CR6 또는 OIG37라고도 함) 유전자를 포함하는 종양 치료용 백터, P972 유전자를 세포내에서 발현시킬 수 있는 아데노바이러스, 상기 아데노바이러스를 생산하는 방법, 상기 백터 또는 아데노바이러스를 이용한 암 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 아데노바이러스 클론은 자궁경부암, 유방암, 대장암 등을 포함한 다양한 항암 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 4

【색인어】

유전자 치료용 발현 백터, 아데노바이러스, 아데노바이러스백터, 항암 유전자 치료, P972, Gadd45 γ

【명세서】**【발명의 명칭】**

피972 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 피972 유전자를 세포내에서 생산할 수 있는 아데노바이러스{Expression vector for expressing P972 gene for cancer therapy and adenovirus producing the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 아데노바이러스 발현 벡터 pxcx2dCMV-P972의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 아데노바이러스 발현 벡터를 이용하여 얻은 아데노바이러스를 감염시킨 MCF7, HeLa 세포주에서 P972 단백질이 생산되는 양상을 웨스턴 블로트로 분석하여 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 아데노바이러스 AdP972로 감염시킨 MCF7 세포주의 모양을 위상차현미경으로 관찰한 것이다.

도 4는 본 발명의 아데노바이러스 AdP972으로부터 생산되는 P972 단백질이 대장암 세포주인 RKO의 성장을 억제시키는 양상을 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 아데노바이러스 AdP972으로부터 생산되는 P972 단백질이 유방암 세포주인 MCF7의 성장을 억제시키는 양상을 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 아데노바이러스 AdP972으로부터 생산되는 P972 단백질이 자궁경부암 세포주인 HeLa의 성장을 억제시키는 양상을 그래프로 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <7> 본 발명은 세포성장 억제 유전자를 포함하는 유전자 치료용 백터, 상기 유전자를 세포내로 전달할 수 있는 아데노바이러스 및 상기 백터를 항암 치료에 사용하는 방법에 관한 것이다.
- <8> 유전자 치료(gene therapy)는 치료가 어려운 암 혹은 그 밖의 유전성 질환의 분자 생물학적, 생화학적 원인을 조사한 후, 그 질환을 화학적으로 합성한 약제가 아닌 생체 내 존재하는 유전자에서 만들어지는 산물로 치료하는 기술이다. 이런 유전자 치료법은 인공 제조한 약제가 아닌 실제 생체 내에서 질병에 대한 방어 기작 과정에서 나오는 산물들을 이용하는 특징을 가지고 있어 그 효능 및 부작용에 있어 화학합성제제들보다 많은 장점을 가지고 있다. 1970년대 초 유전자의 기능을 알게 되고 많은 유전병과 관련된 유전자를 발견하게 됨으로써 선천적인 질병을 근원적으로 공격함으로써 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라는 생각을 하게 되었으며, 시간이 흐르면서 후천성 질병까지 유전자 치료의 대상이 될 수 있다는 사실을 알게 되었다. 1990년 9월 미국에서 프렌치 앤더슨 (French Anderson) 그룹에 처음으로 유전자를 이용하여 종합면역결핍증을 앓고 있는 환자에게 치료한 이래 최근 들어 2천5백명 이상의 환자들이 이런 요법의 임상실험을 받고 있다.
- <9> 항암 치료는 현재까지 외과적수술, 방사선 혹은 약물을 이용한 치료, 면역촉진제를 이용한 과다한 면역 반응으로 암세포를 사멸시키는 방법, 호르몬을 이용하는 방법 등이

사용되고 있으나 그 부작용 때문에 새로운 안전한 치료법이 요구되어 왔다. 최근들어 시험되고 있는 항암 치료에 사용되고 있는 유전자 요법은 첫째 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)의 티미딘 키나제(thymidine kinase) 혹은 대장균의 시토신 디아미나제(cytosine deaminase) 등의 자살 유전자 (suicide gene)를 암세포에 주입하고 독성이 없는 약물의 전구체가 위의 자살 유전자에 의해 암세포를 사멸시킬 수 있는 독성 약물로 반응이 일어나게 하여 치료하는 방법이다. 두번째는 면역 반응을 유발시키는 유전자 혹은 사이토카인(cytokine) 등을 이용하여 면역 반응에 의해 암세포를 제거하는 방법이다. 세번째는 혈관 형성을 억제하는 유전자를 주입하여 암세포가 혈관을 통한 산소 공급을 받지 못하여 성장하지 못하도록 하는 치료법이다. 네번째는 암세포의 사멸을 유도하는 유전자의 도입에 의해 방법으로, 암 억제 단백질인 p53이 널리 쓰여지고 있으며, 최근에는 세포 사멸 프로그램(programmed cell death)에 관여한다고 알려진 카스파제-3 (caspase-3) 등이 세포 사멸을 통한 암 억제 유전자로 쓰이고 있다. p53 단백질은 암 억제 단백질로서의 유용성이 널리 알려져 이를 이용한 다양한 항암 유전자 요법의 개발이 시도되고 있다. 지금까지 리포좀과 여러가지 바이러스를 전달매체로 한 방법이 시도되었고 실제로 미국 국립 암연구소 (National Cancer Institue) 주도로 1상 임상 실험이 진행중에 있다. 방광암, 유방암, 폐암, 난소암 등에서 그 안정성을 시험하고 있으며, 후두암과 간암에서는 안정성이 어느 정도 인정되고 있다.

<10> 이런 유전자 치료는 다양한 요법에 의해 적용되고 있는데, 초기에는 결손유전자를 가진 세포를 환자에게서 떼어낸 후 정상 유전자를 주입한 후 몸속으로 되돌려 보내는 방법이 이용되었다. 하지만 이 방법은 결손유전자를 가진 세포가 일정

기간만 생존할 수 있는 세포인 경우 주기적으로 치료를 되풀이 해야하는 단점을 가지고 있다. 이런 단점이 어느 정도 보완된 방법이 바이러스 등을 이용하여 정상유전자를 직접 결손유전자를 가진 세포내로 운반하는 방법이다. 이 방법은 결손유전자를 운반하는 역할을 할 뿐만 아니라 최근 세포를 죽게 만드는 유전자를 종양 등에 심어 암세포를 직접 죽게 만들거나 다른 화학요법에 의해 좀더 암세포를 쉽게 죽게 만드는 연구가 진행되고 있다. 인체에 감염성이 있는 바이러스를 이용하면 세포내에 외래 유전자를 효과적으로 주입할 수 있으므로 바이러스를 유전자 요법에 이용하는 것이 매우 바람직하다. 구체적으로, 치료에 사용될 수 있는 유전자를 유전자 재조합 방법으로 바이러스 DNA에 삽입하고 이를 생체외에서 대량 생산하여 인체에 직접적으로 감염시킴으로써 세포내에 효율적으로 원하는 유전자를 전달하여 발현시킬 수 있다. 특히, 아데노바이러스는 사람 세포에 유전자를 전달하는 기능이 다른 유전자 요법에 쓰이는 바이러스들보다 뛰어나 유전자 치료 요법에 유용하게 쓰이고 있다.

<11> P972 유전자는 세포성장 억제 혹은 DNA 손상 관련 유전자로 발견되었다 (Takekawa M 등, 1998. Cell 13:521-5301; Nakayama K, T 등, 1999. J. Biol. Chem. 274:24766-24772). 세포의 성장은 주위 환경의 신호나 내부적인 프로그램에 의해서 세포주기의 조절로 이루어지는데, 세포주기가 멈추게 되면 세포는 분화, 사멸, 노화 등의 경로를 거지게 된다. 이러한 정확한 조절기작에 결함이 생기게 되면 외부의 신호나 내부의 프로그램에 관계없이 계속적으로 분열만 하는 암세포로 전이된다. 구체적으로 P972 유전자의 기능이 정확히 밝혀지지는 않았지만, 세포내

에 주입되었을 경우 세포의 사멸을 유도한다고 보고된 바 있으며, 최근에는 DNA 손상이 유발될 경우 세포주기를 G1혹은 G2에 멈추게 하여 DNA 손상을 복구하는 과정이 일어나게 하거나 외부 사이토카인에 의해 면역세포들의 분화를 유도할 때에 세포주기를 멈추게 하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <12> 본 발명은 P972 유전자를 세포내에서 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 제공함에 그 목적이 있다.
- <13> 또한 본 발명은 P972 유전자를 세포내에서 발현시킬 수 있는 아데노바이러스 발현 벡터를 제공함에 그 목적이 있다.
- <14> 또한 본 발명은 세포내에서 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 아데노바이러스 발현 벡터를 포함하는 아데노바이러스 클론을 제공함에 그 목적이 있다.
- <15> 또한 본 발명은 세포내에서 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 아데노바이러스 발현 벡터를 포함하는 아데노바이러스 클론을 생산하는 방법을 제공함에 그 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <16> 본 발명은 P972 유전자를 세포내로 전달할 수 있는 전달체 및 세포내에서 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 유전자 치료용 발현 벡터에 관한 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 P972 유전자와 그것에 작동가능하도록 연결되고 상기 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로 이루어진다.
- <17> 본 발명에서 P972 유전자는 야생형 P972 유전자(GenBank Accession

No.: AF078078)뿐 아니라 필요한 경우, 야생형 P972 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 그것과 기능적으로 동일한 단백질을 코딩하도록 변형된 P972 유전자까지 포함한다. 야생형 인간 P972 cDNA는 공지된 P972 DNA 서열을 이용하여 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 등에 의해 제조할 수 있다.

- <18> 본 발명에서 P972 유전자는 세포내에서 P972 유전자가 발현되도록 하는 인자를 하나 이상 포함할 수 있으며, 예를 들어 프로모터, 응답인자(response elements), 인핸서 등을 포함할 수 있다. 한 예로써, 프로모터로 CMV, SR-알파 등이 선택될 수 있다.
- <19> 본 발명에서 P972 유전자를 세포로 전달할 수 있는 전달체로는 예를 들어 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관(adeno-associated) 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스성 벡터 또는 리포솜-매개 또는 리간드/폴리-L-라이신 컨쥬게이트와 같은 비바이러스성 벡터 등을 사용할 수 있다.
- <20> 전달체로 벡터를 이용하는 경우, 벡터의 종류는 특별히 한정되지 않으며 P972 유전자를 숙주 세포에서 발현시킬 수 있는 벡터는 모두 사용할 수 있다.
- <21> 바람직한 예로, 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 아데노바이러스벡터이다.
- <22> 아데노바이러스는 DNA 바이러스로서, 게놈 DNA 크기는 약 36 kbp이며 그 게놈에 바이러스가 증식하는데 필수적인 유전자인 E1a 유전자 부위와 바이러스가 패키징되는데 필수적인 유전자 등이 포함되어 있다. 이러한 아데노바이러스가 유전자 요법에 이용되기 위해서는 바이러스가 체내에서 스스로 증식하여 온몸에 감염됨으로써 또 다른 질병이 유발되지 않도록 바이러스 증식에 사용되는 유전자를 제거하는 것이 필요하다. 따라서, 아데노바이러스 게놈 중에 바이러스가 증식하는데 관여하는 유전자 부위를 제거하면 바이

러스가 스스로 정상세포에 증식할 수 없어 아데노바이러스를 유전자 요법에 이용할 수 있다.

<23> 세포내에서 성장억제 유전자 및 DNA 손상 관련(growth arrest and DNA damage induced) 단백질인 P972 단백질을 생산할 수 있는 아데노바이러스를 제조하기 위하여, 아데노 바이러스 게놈 DNA에서 E1 유전자 부위를 제거하고 그 자리에 야생형 P972 유전자를 포함하는 발현 카세트를 대신 삽입함으로써 P972 단백질을 생산할 수 있는 발현 벡터를 제조할 수 있다.

<24> 그러한 바이러스의 예로 본 발명에서는 사이토메갈로바이러스 (Cytomegalovirus)의 최전 프로모터 (immediately early promoter), 다클로닝 부위 및 시미언바이러스 40(Simian virus 40, SV 40)의 후 아데닌다중화(late polyadenylation) 신호로 구성되는 발현 카세트를 포함하는 아데노바이러스 발현벡터 pxcx2dCMV를 이용하였다. 발현벡터 pxcx2dCMV는 생명공학연구소(대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52번지)의 임동수 박사로부터 입수할 수 있다.

<25> 따라서, 본 발명에서는 P972 유전자를 포함하는 유전자 치료용 벡터의 한 예로 pxcx2dCMV-p972를 제공한다.

<26> PCR에 의해 얻은 야생형 인간 P972 cDNA를, 상기 발현 벡터 pxcx2dCMV의 다클로닝 부위의 HindIII와 XhoI 제한효소 부위에 삽입함에 의해 P972 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터 pxcx2dCMV-P972를 제조한다(도 1 참조).

<27> 또한 본 발명은 세포내에서 P972를 발현시킬 수 있는 아데노바이러스 발현 벡터를 포함하는 아데노바이러스 클론을 제공한다.

<28> 또한 본 발명은 항암 유전자 요법에 사용될 수 있는 상기 아데노바이러스 클론을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 상기 아데노바이러스 발현 벡터를 아데노바이러스가 증식하는데 필요한 유전자를 포함하는 아데노바이러스 모체벡터와 함께 패키징 세포에 형질변환시켜 얻은 아데노바이러스 클론 중 증식성 재조합 변이 아데노바이러스를 생산하지 않는 바이러스 클론을 선별하여, 세포 내에서 P972를 발현시킬 수 있는 아데노바이러스 발현벡터를 포함하는 아데노바이러스 클론 AdP972를 제조한다. 이 때, 아데노바이러스가 필요로 하는 유전자를 포함하는 아데노바이러스 모체벡터로는 아데노바이러스 벡터 pBHG10을 사용하는 것이 바람직하고, 패키징 세포로는 293 세포를 사용하는 것이 바람직하다.

<29> 본 발명에서는 선별한 아데노바이러스 클론을 AdP972로 명명하고 이를 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52번지에 주소를 둔 생명공학연구소 부설 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)에 2000년 6월 21일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 0806BP를 부여받았다.

<30> 본 발명의 아데노바이러스 발현 벡터를 이용하여 아데노바이러스를 대량으로 얻기 위하여, 아데노바이러스가 패키징될 수 있는 세포를 상기 벡터로 형질전환시킨다 (transfection). 구체적으로 패키징 세포주로 293 세포를 이용할 수 있는데, 293 세포는 그의 염색체 DNA에 아데노바이러스의 E1 유전자 부위를 포함하고 있어 E1a 유전자를 계속적으로 발현하고 세포내에 E1a 단백질을 제공한다.

<31> 아데노바이러스의 게놈 DNA는 크기가 약 36 kbp 정도로 매우 커서 유전자를 조작하는데에 큰 어려움이 있으므로 아데노바이러스 벡터에는 아데노바이러스 전체 DNA가 아닌 일부 DNA만을 포함시킨 다음 아데노바이러스의 모체 벡터를 사용하여 이들이 증식하는

데 필요한 유전자 및 단백질을 공급할 수 있는데, 이러한 경우, 모체 벡터로는 상용화된 모체 벡터세포 pBHG10 또는 pJM17 등을 사용할 수 있다.

<3> 본 발명에서는 한 예로, 아데노바이러스 발현 벡터를 패키징 세포에 상기 아데노바이러스 모체 벡터와 함께 주입하면 상기 아데노바이러스 발현 벡터가 대량으로 증식되고 동시에 아데노바이러스가 패키징되는데 필요한 유전자도 발현됨을 확인하였다. 보통 한 개의 293 세포에서 약 1만개의 아데노바이러스 입자가 만들어지며 이렇게 세포내에 축적된 바이러스는 숙주세포를 물리적으로 파쇄하고 원심분리함으로써 순수하고 용이하게 정제될 수 있다.

<33> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 P972 발현벡터 및/또는 P972 발현벡터를 포함하는 바이러스 클론을 암의 치료에 사용하는 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 발현벡터 및 아데노바이러스 클론은 자궁경부암, 유방암, 대장암 등을 포함한 다양한 항암 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<34> 구체적으로, 본 발명의 발현 벡터 또는 상기 바이러스 클론은 인체내에 암이 생긴 부위에 감염시킬 수 있으며, 이에 의해 암이 진행되는 것을 억제하거나 암세포를 사멸시켜 암을 치료할 수 있다.

<35> 본 발명은 P972 단백질의 활성을 조사하기 위하여 상기에서 아데노바이러스 클론을 분리하여 세포내에 P972 단백질의 발현을 볼 수 없는 암 세포주에 감염시켜 P972의 단백질이 생산되는 것을 확인하고, 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 바이러스 클론을 각종 암 세포에 감염시켜 세포를 사멸시키거나 세포성장을 억제하는 효과를 확인하였다(도 3과 4 참조). 구체적으로 본 발명은 암 세포주로 유방암에서 유래한 MCF7 세포주, 자궁경부암에서 유래한 HeLa 세포주, 대장암에서 유래한 RKO 세포주를 사용하였으나, 이들

예에 한정되는 것은 아니다.

<36> 본 발명에서, 본 발명에 따른 바이러스 클론이 세포성장에 미치는 효과는 생존 세포 수 측정을 이용한다.

<37> 생존 세포 수 측정 방법

<38> 1.5 x 10⁵개의 세포를 60 mm 배양접시에 심고 24시간동안 배양한 후 아데노바이러스를 100 pfu/세포의 농도로 처리한다. 다음 매 24시간마다 트립신/EDTA로 세포를 배양 접시에서 떼어낸 후 최종 농도가 0.07%(v/v)가 되도록 2.5% 트립판블루와 세포를 섞는다. 5분동안 상온에서 반응시킨 후 세포 수 측정 슬라이드(hemacytometer)를 이용하여 염색되지 않은 살아있는 세포 수를 측정한다.

<39> 이하, 본 발명의 실시예에 의해 더욱 상세히 설명되다.

<40> 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<41> 실시예 1. 아데노바이러스 발현 벡터의 제조

<42> 야생형 P972 유전자를 포함하는 아데노바이러스 발현 벡터를 제조하기 위하여, 발현 벡터 pxcx2dCMV를 이용하였다. 0.5 kbp 크기의 야생형 P972 cDNA를 PCR을 통하여 얻었다. 이를 제한효소 HindIII와 XhoI으로 절단한 후, 동일한 제한 효소로 절단한 pxcx2dCMV 발현 벡터에 삽입하여 아데노바이러스 발현 벡터 pxcx2dCMV-P972를 제조하였다(도 1 참조).

<43> 실시예 2. p972 항체 제조

<44> P972의 유전자를 대장균에서 단백질로 발현할 수 있는 벡터 pGEX4T(파마시아사)에 삽입하여 대장균에서 발현시킨 후, 그 단백질을 이용하여 토끼에서 P972 단백질에 대한 항체를 제조하였다.

<45> 실시예 3. 아데노바이러스 클론의 제조

<46> 세포에 감염되어 P972 단백질을 생산할 수 있는 아데노바이러스 클론을 제조하기 위하여, 아데노바이러스 발현 벡터 pxcx2dCMV-P972를 아데노바이러스 모체 벡터 pBHG10(임동수 박사 제공, 생명공학연구소, 대전, 한국)과 함께 폐키징 세포인 293 세포에 인산 칼슘 방법으로 형질전환시켰다. 이 때 형질전환은 60 mm 크기의 배양접시를 사용하여 수행하였고 바이러스에 의한 플라크가 생성됨을 확인하였다. 제조된 아데노바이러스 클론 AdP972가 P972 단백질을 생산하는지를 알아보기 위하여, 제조된 아데노바이러스 클론을 유방암 세포주 MCF7 세포주와 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에 감염시킨 후 48 시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양한 세포를 실시예 2에서 제조된 항체를 이용한 웨스턴 블로트를 수행하여 P972 단백질의 발현을 확인하였다.

<47> 위에서 얻은 아데노바이러스를 100 mm 배양접시에서 자란 293 세포주에 감염시키 증식시키고 세포를 10% 소태아혈청을 포함한 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 파쇄하여 아데노바이러스 클론을 제조하였다. 바이러스 클론의 타이터는 상기 293 세포의 플라크 수를 측정하여 결정하였다.

<48> 대조군으로 사용하기 위하여, 각각 발현벡터 pxcx2dCMV-p53와 pxcx2dCMV-GFP를 포함하는 아데노바이러스 클론 Adp53와, AdGFP는 생명공학연구소의 임동수 박사로부터 입수하였다.

<49> 실시예 4. 웨스턴블로팅 분석

<50> 실시예 3에서 제조된 아데노바이러스클론으로 형질전환된 세포주에서 P972 단백질의 발현을 확인하기 위하여 웨스턴블로팅을 수행하였다. 100 pfu/세포의 농도의 아데노바이러스 AdP972를 처리한 세포를 SDS 시료 완충용액 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% 소디움 도데실 살피아트, 5% β-멀캡토에탄올, 10% 글리세롤, 0.01% 브로모페놀 블루]에 서 파쇄하였다. 50 μg 세포내 단백질을 14% SDS-폴리아크릴아마이드 전기영동을 수행하여 분리하고 이를 PVDF 필터페이퍼(밀리포어사)에 이동시켰다. 상기 필터를 0.1% 트원20 및 5% 분유가 포함된 인산완충용액으로 블로킹하였다. 단백질은 실시예 2에서 제조한 항-P972 항체로 탐지하고 호스래디쉬 페옥시다제 결합 항-토끼 항체(잭슨이뮤노리서치사)를 사용하여 표지하였다. 단백질 랜드는 ECL 키트 (에머샴사)를 사용하여 증가된 화학발광 (enhanced chemiluminescence)에 의하여 확인하였다(도 2).

<51> 실시예 5. 각종 세포주의 배양

<52> 본 발명에서 사용한 유방암 세포주 MCF7 세포주와 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주는 ATCC사에서 구입하였고, 10% 소태아혈청을 포함한 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 대장암 세포주인 RKO 세포주는 포네이스 (A. Fornace, National Cancer Institute, USA)로부터 분주받았으며, 10% 소태아혈청을 포함한 배지 (RPMI1640)에서 배양하였다.

<53> 실시예 6. 아데노바이러스 AdP972의 항암 효과

<54> 실시예 3에서 제조된 아데노바이러스 클론을 항암 유전자 요법에 사용할 수 있는지 확인하기 위하여, 실시예 5 방법으로 배양한 각 암세포주에 아데노바이러스 클론

AdP972를 처리하여 이로부터 발현된 P972 단백질이 암의 진행에 미치는 효과를 조사하였다.

<55> MCF7 세포주에 아데노바이러스 AdP972와 AdGFP를 각각 100 pfu/세포의 농도로 처리하여 36시간 배양한 후 위상차현미경과 현광현미경을 통해 세포를 관찰하였다. P972의 발현에 의해서 세포의 성장이 현격히 억제됨을 관찰되었다(도 3).

<56> RKO 세포주, MCF7 세포주와 HeLa 세포주에 아데노바이러스 AdP972를 100 pfu/세포의 농도로 처리하여 생존 세포 수 측정으로 수행하였다. 대조군으로 대상 세포에 아데노바이러스 Adp53와 AdGFP를 각각 100 pfu/세포의 농도로 처리하여 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

<57> 그 결과, 상기 세가지 암세포 모두 P972의 발현에 의해서 세포의 성장이 현격히 억제됨을 관찰되었으며, P972 유전자가 p53에 비해 항암 효과가 뛰어나다는 것이 확인되었다(도 4, 5, 6).

<58> 대조군으로 이용한 AdGFP 아데노바이러스는 세포성장을 미미하게 억제하였는데, 이는 GFP 단백질에 의한 것이라기보다 아데노바이러스 클론에서 발현되는 바이러스 단백질에 의한 것으로 보인다.

【발명의 효과】

<59> 본 발명의 P972를 포함하는 발현 백터는 암세포를 사멸시키거나 암세포의 성장을 억제시키는데 탁월한 효과를 나타낸다. 따라서 암을 치료하기 위한 유전자 치료에 이용될 수 있다.

020000044142

2001/7/1

【특허청구범위】

【청구항 1】

P972 유전자와 그것에 작동가능하도록 연결되고 상기 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로 이루어지는 발현 벡터.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 발현 벡터가 암 치료용인 발현 벡터.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 암이 유방암, 자궁경부암, 또는 대장암인 발현벡터.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 발현벡터가 아데노바이러스인 발현벡터.

【청구항 5】

P972 유전자와 그것에 작동가능하도록 연결되고 상기 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로 이루어지는 발현 벡터를 포함하는 아데노바이러스.

【청구항 6】

P972 유전자와 그것에 작동가능하도록 연결되고 상기 P972 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로 이루어지는 발현 벡터로 형질전환된 세포주.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 발현 벡터가 암 치료용인 숙주세포.

020000044142

2001/7/1

【청구항 8】

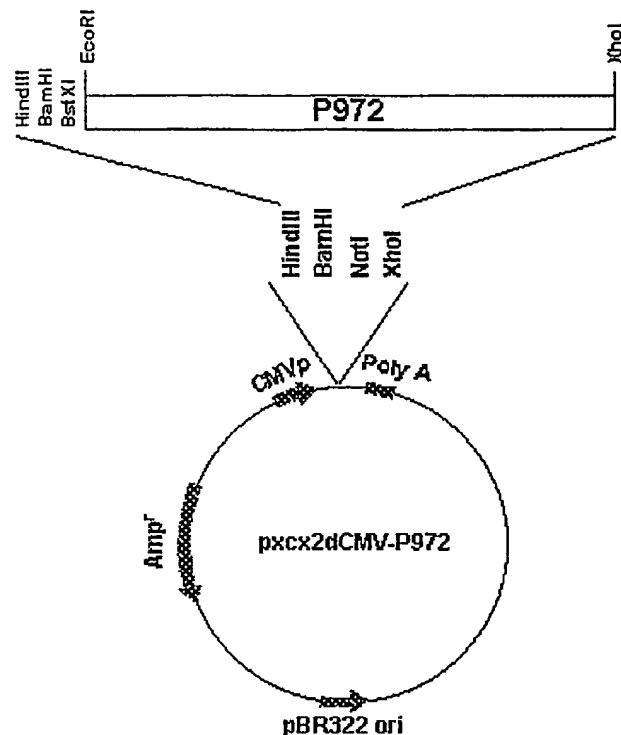
제6항에 있어서, 상기 암이 유방암, 자궁경부암 또는 대장암인 숙주세포.

1020000044142

2001/7/1

【도면】

【도 1】



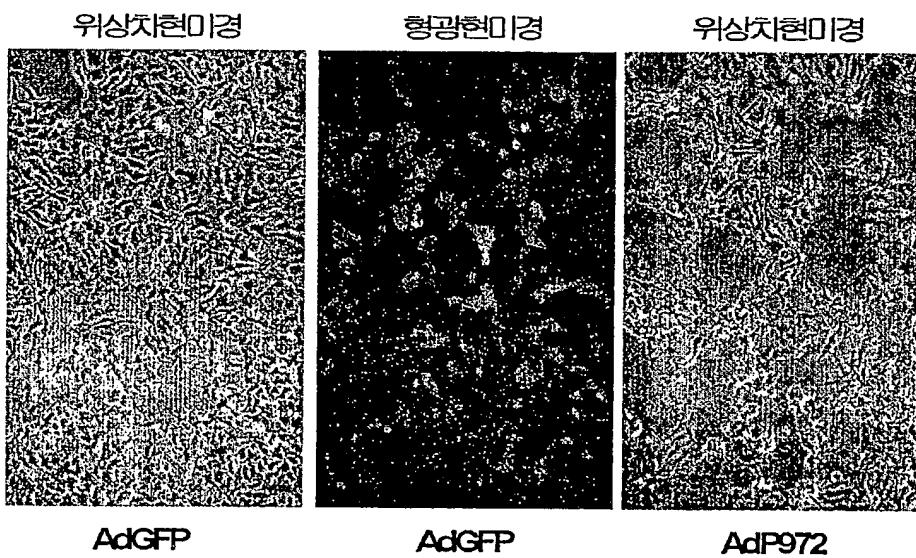
1020000044142

2001/7/1

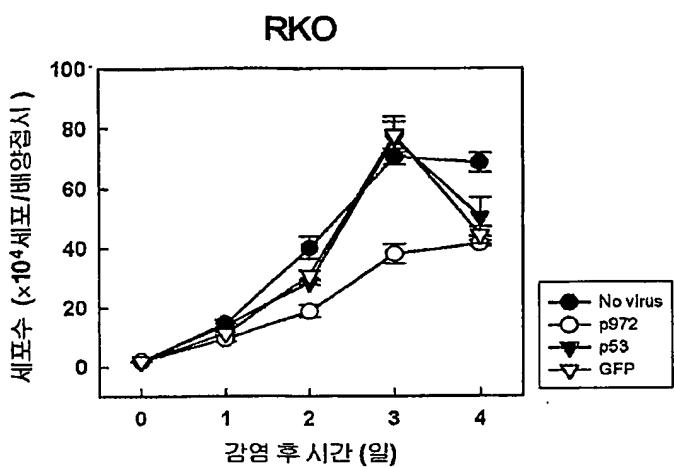
【도 2】



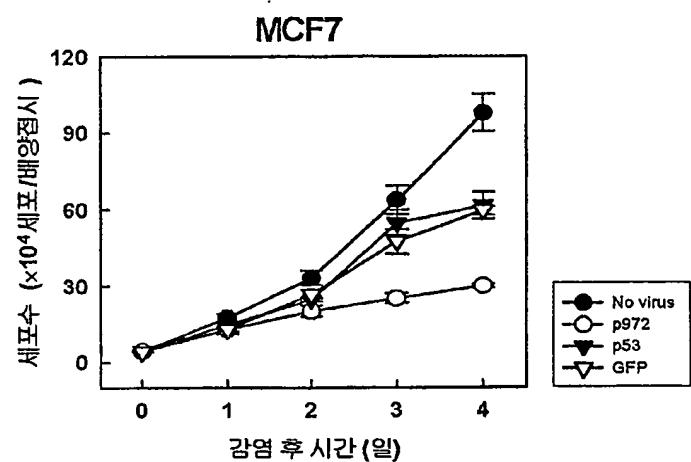
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【도 6】

